

## 사용의 편리성과 강력한 증폭효율을 겸비한 다카라 PCR 효소

# EmeraldAmp PCR Master Mix & MightyAmp DNA Polymerase

유전자공학연구에 없어서는 안되는 PCR 기술은 적용 분야가 확장됨에 따라 PCR의 목적이나 취급하는 샘플이 매우 다양해지고 있다. 이에 따라 실험 용도에 적합하도록 특성화된 PCR 시약에 대한 요구도 증가하고 있다. 다카라에서는 전기영동해석이 필요한 다검체의 PCR과 인서트 확인을 위한 콜로니 PCR 등에 간편하게 적용할 수 있는 고감도 EmeraldAmp PCR Master Mix (TaKaRa Code RR300A)를 개발했으며, PCR 저해 물질을 다량 포함하는 crude 추출 샘플도 양호하게 증폭을 할 수 있는 MightyAmp DNA Polymerase (TaKaRa Code R070A)를 출시하였다. 본 고에서는 새로운 PCR 시약의 특징과 실험예를 소개하고자 한다.

### [1] 사용이 편리한 EmeraldAmp PCR Master Mix

- Loading dye가 포함된 2 x premix 타입으로 프라이머와 주형 DNA만 있으면 PCR 가능
- Hot Start PCR용으로 반응액의 실온조제가 가능
- 선명한 녹색(emerald green) loading dye가 포함되어 있어 샘플 로딩(loading)이 용이
- 콜로니 PCR에 의한 인서트 확인에 최적

EmeraldAmp PCR Master Mix는 PCR에 필요한 효소 반응액과 전기영동에 필요한 loading dye를 포함하는 2 x premix 타입의 시약이다. 프라이머와 주형DNA 첨가만으로 신속하게 PCR를 시작할 수 있고 반응 후에는 반응액을 곧바로 전기영동할 수 있기 때문에 각 실험 단계를 간소화할 수 있다. 본 PCR효소는 loading dye와 비증제를 포함한 반응액을 최적화하여 폭넓은 타겟 증폭에 적용 가능하다. 또한, Hot start PCR 용으로 실온에서 반응액을 조절할 수 있으며 인간 게놈 DNA를 10 kb까지 증폭할 수 있다. 이러한 특성으로 콜로니 PCR에 최적이며, PCR 반응액에 직접 제한 효소를 처리하거나 직접 T/A-클로닝에 적용할 수 있으며 Exo I-SAP 처리 후 sequencing 반응 등에 곧바로 이용할 수 있다.

추가적으로 본 제품은 선명한 녹색(emerald green)을 띠고 있기 때문에 반응액의 로딩이 용이하고 파란색과 노란색 밴드를 통해 전기영동 상황을 확인할 수 있다(그림 1).

### ■ 제품구성 (50 µl 반응시 160 회)

EmeraldAmp PCR Master Mix (2×Premix)	1 ml×4
dH <sub>2</sub> O	1 ml×4



그림 1. Loading 직후 및 전기영동중 겔 사진

### ■ 실험예 1 : 동일 PCR 조건에서의 다양한 타겟의 증폭 (주형: 인간 게놈 DNA)

#### 【방법】

본 제품과 인간 게놈 DNA (100 ng)를 이용하여 동일한 3 step PCR 조건(98℃ 10초/ 55℃ 30초/ 72℃ 6분(30 cycles))에서 다양한 영역을 증폭하였다. Loading dye가 포함된 A사와 B사의 premix PCR 제품도 권장조건을 기반으로 동일조건(신장시간: 6분)으로 증폭하여 결과를 비교하였다. 본고에 기재된 PCR 증폭은 모두 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa Code TP600)를 사용하였다.

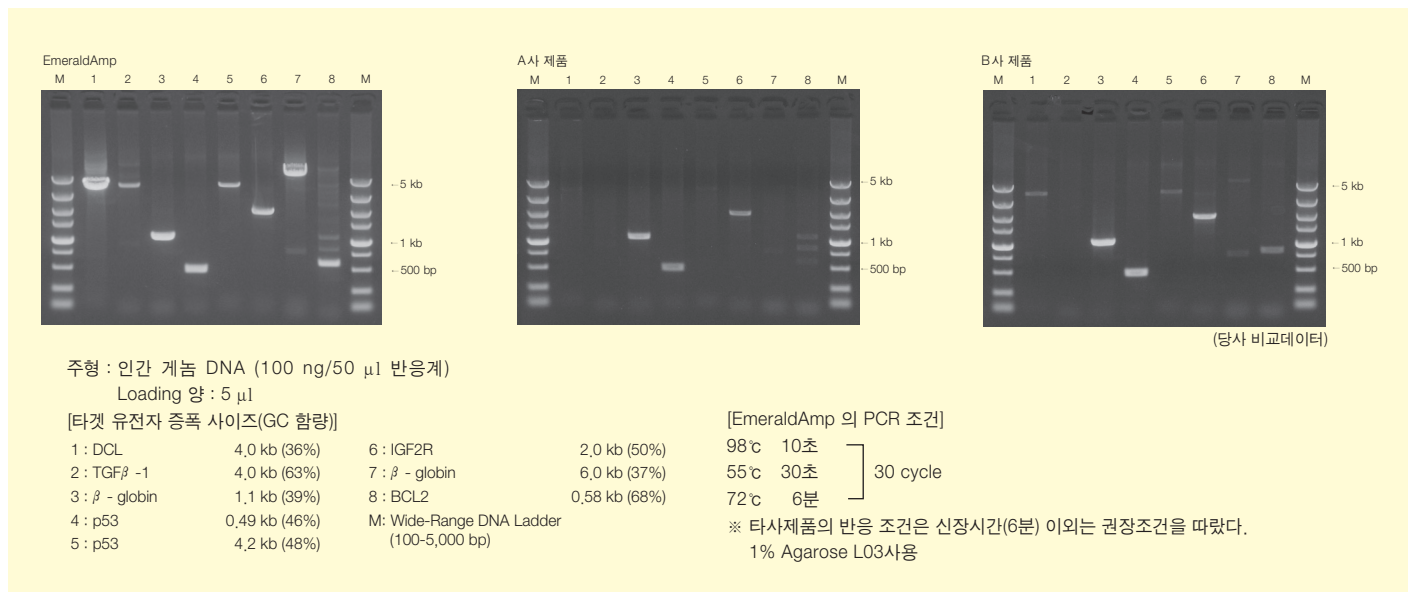


그림 2. 동일 PCR 조건에 의한 다양한 타겟의 증폭

continued...

**【결과】**

EmeraldAmp PCR Master Mix 에서는 증폭길이 (0.5~6 kb), GC 함량(36~68%)에 관계없이 동일한 반응 조건에서 양호한 타겟 증폭을 확인할 수 있다 (그림 2).

참고로 GC 함량이 높아 비특이적인 증폭산물이 나타날 때 annealing 온도를 높이면, 특이성이 향상되는 경우가 있다.

**■ 실험에 2 :** 콜로니 PCR에 의한 인서트 확인-1 (1 kb 전후의 cDNA Library)

**【방법】**

pBlueScript II SK+ (Stratagene 사)에 1 kb 전후의 인간 cDNA를 클로닝하고 대장균에 형질전환하였다. 본 제품을 이용하여 선별된 백색 콜로니를 T7과 T3 프라이머로 콜로니 PCR하여 인서트를 확인하였다(그림 3).

**【결과】**

확인한 16개의 클론에서 모두 0.5 kb ~ 1.5 kb의 인서트를 확인할 수 있었다(그림 4).

EmeraldAmp PCR Master Mix 를 이용하면 간편하고 효율적으로 콜로니 PCR을 수행할 수 있다.

**■ 실험에 3:** 콜로니 PCR에 의한 인서트 확인-2 (5 kb 이상의 *E. coli* 게놈 library)

**【방법】**

5 kb 이상의 *E. coli* 게놈 DNA 단편을 pUC19에 클로닝하여 대장균을 형질전환하였다. 본 제품을 이용하여 선별된 백색 콜로니를 M4와 RV 프라이머로 콜로니 PCR을 수행하여 인서트를 확인하였다.

**【결과】**

PCR반응에 적용한 8개의 클론 모두 인서트를 포함한 것으로 확인되었다(그림 5).

EmeraldAmp PCR Master Mix를 이용하면 5 kb 넘는 긴단편도 간단하고 확실하게 콜로니 PCR로 확인할 수 있다.

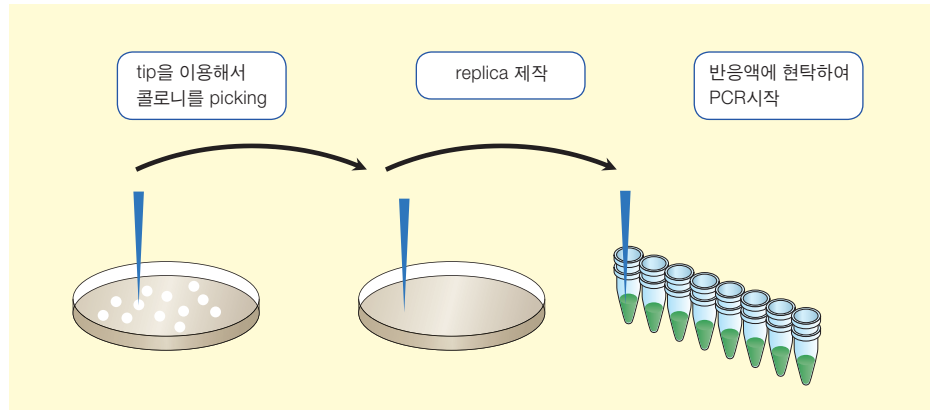


그림 3. 콜로니 PCR 방법

**■ 실험에 4:** EmeraldAmp PCR Master Mix 로 얻은 PCR 산물의 제한효소 처리

우 약 600 bp과 약 1.2 kb의 산물을 얻을 수 있었다.

**【방법】**

PCR 후 정제하지 않고 반응액에 직접 제한효소 처리하여 전기영동 밴드를 확인할 수 있는지 실험하였다. 실험은 pUC19 DNA를 주형으로 MCS 영역을 포함하는 약 1.8 kb 의 PCR 증폭산물을 얻었다. PCR 반응액 5 µl 에 MCS 영역을 절단하는 각 제한효소 0.5 µl 을 첨가하였다. 각 제한효소의 반응 온도로 30분간 반응 후, 전량 (5.5 µl) 을 전기영동하였다. 정확하게 절단되었을 경

**【결과】**

MCS 영역내의 13종의 제한효소 사이트 모두 특이적으로 절단되는 것을 확인하였다.

30분간 반응에서 *Sal* I 은 일부만 잘렸지만, 그 이외의 12종류의 제한효소에서는 완전하게 절단된 것을 확인하였다(그림 6). 이와 같이 EmeraldAmp PCR Master Mix로 증폭한 PCR 산물은 정제없이 반응액에 직접 제한효소 처리하여 곧바로 전기영동할 수 있으므로 실험 단계를 대

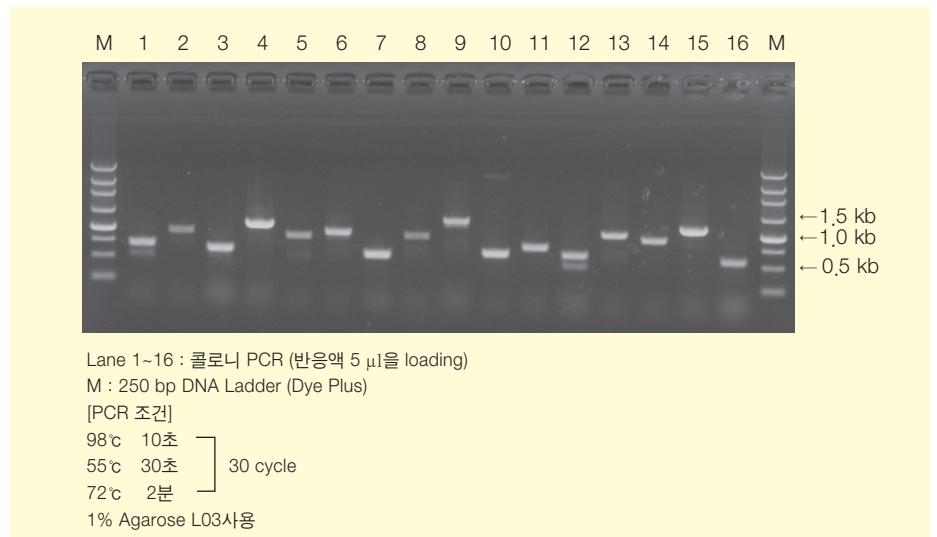


그림 4. 콜로니 PCR에 의한 인서트 확인-1

## 사용의 편리성과 강력한 증폭효율을 겸비한 다카라 PCR 효소

# EmeraldAmp PCR Master Mix & MightyAmp DNA Polymerase

폭 감소화 시켰다.

### [2] Crude 샘플 증폭에 적합한 MightyAmp DNA Polymerase

- PCR 저해 물질을 다량 포함하는 crude 샘플 증폭에 최적
- 저해물질이 존재하는 소량의 주형 증폭이나 GC rich 또는 AT rich인 타겟 증폭에도 적합
- 98℃ 까지 polymerase 활성을 억제하는 강력한 HotStart 항체를 사용

MightyAmp DNA Polymerase (TaKaRa Code R070A)은 2 kb 이하의 짧은 단편 증폭에 최고의 반응성을 보유한 다카라의 새로운 DNA polymerase이다. 본 효소를 사용하면 일반적인 PCR 효소로는 증폭이 어려운 PCR 저해 물질을 다량 함유한 crude 샘플이나, GC rich 또는 AT rich 서열 등에 관계없이 광범위한 타겟의 양호한 PCR 증폭이 가능해졌다. 또한 소량의 주형을 이용한 반응시에도 양호한 증폭효율을 보인다. 본 고에서는 crude 샘플의 PCR 증폭을 간편하게 할 수 있는 다양한 실험예를 소개하고자 한다.

#### ■ 제품구성 (50 µl 반응시 200 회)

MightyAmp DNA Polymerase (1.25 U/µl)	200 µl
2×MightyAmp Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus, dNTP plus)	1 ml×5

#### ■ 실험예 5 : 마우스 각 조직의 알칼리 열추출액을 주형으로 하는 PCR

##### [방법]

마우스의 각 조직(꼬리, 간, 비장, 흉선, 뇌) 5~10 mg에 50 mM NaOH를 180 µl 첨가하고, 95℃로 10분간 인큐베이션한 후, 1 M Tris-HCl (pH 8.0)을 20 µl 섞어 알칼리 열추출액을 얻었다. 총 25 µl 반응계에 각 추출액 2.5 µl를 주형으로서 MightyAmp DNA Polymerase, A사와 B사의 저해물질 내성효소, 그리고 TaKaRa Taq Hot Start Version (TaKaRa Code R007A)을 이용해 마우스 Tfrc 유전자 (2 kb)를 PCR 증폭하였다. 각 반응액 3 µl을 전기영동하여 반응성을 비교하였다.

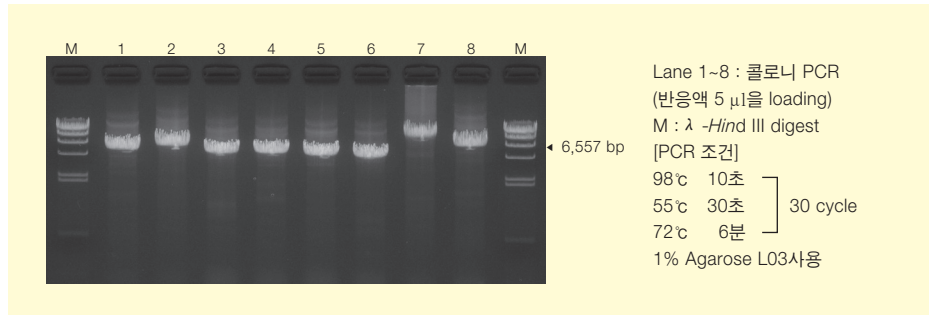


그림 5. 콜로니 PCR에 의한 인서트 확인-2

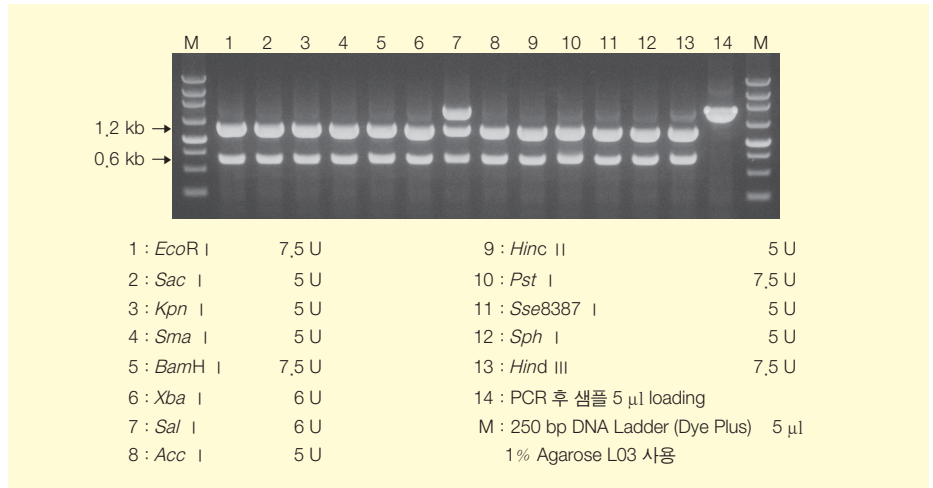


그림 6. PCR 산물의 제한효소 처리

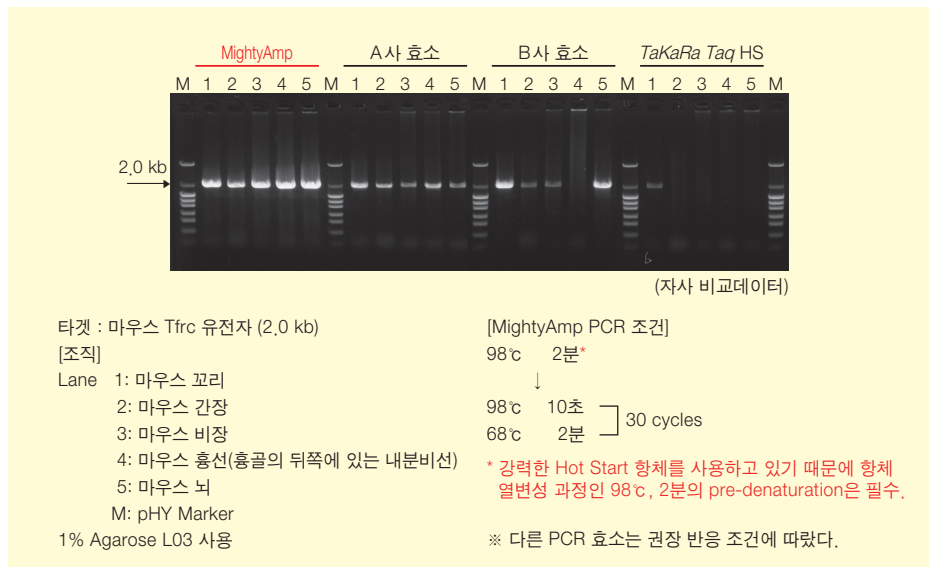


그림 7. 각 조직의 알칼리 열추출액을 주형으로 한 PCR 증폭

**【결과】**

TaKaRa Taq HS 로는 PCR 증폭 산물을 얻을 수 없었던 샘플이 MightyAmp DNA Polymerase 에서는 양호한 증폭을 나타내었으며 타사 저해물질 내성효소와 비교해서도 가장 높은 증폭 효율을 보였다 (그림 7).

■ **실험예 6** : 식물잎에서 간단하게 조제한 추출액을 주형으로 하는 PCR

**【방법】**

5 mm로 자른 시금치와 토마토 잎에 용해 시약\* 100 µl를 첨가하고 95℃, 10분간 인큐베이션하였다. 각 추출액 1 µl를 주형으로 (25 µl반응액) MightyAmp DNA Polymerase, A사 저해 물질 내성효소와 TaKaRa Taq HS를 이용하여 시금치 *coxI* 유전자(약 0.5 kb)와 토마토 XET 유전자(0.65 kb)를 PCR 증폭하였다. PCR 증폭 후 각 반응액 5 µl를 전기영동하여 반응성을 비교했다. 반응성을 비교하기 위해 대조군으로 정제된 DNA 100 ng을 주형으로 동일한 실험을 실시하였다.

\* 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 1 M KCl, 10 mM EDTA

그림 8과 같이 A사 저해물질 내성효소와 TaKaRa Taq HS는 정제된 시금치와 토마토의 DNA를 주형으로 한 경우에만 증폭되었다.

반면 MightyAmp DNA Polymerase는 간단히 조제한 열추출액을 주형으로한 경우도 PCR 증폭이 가능하였다.

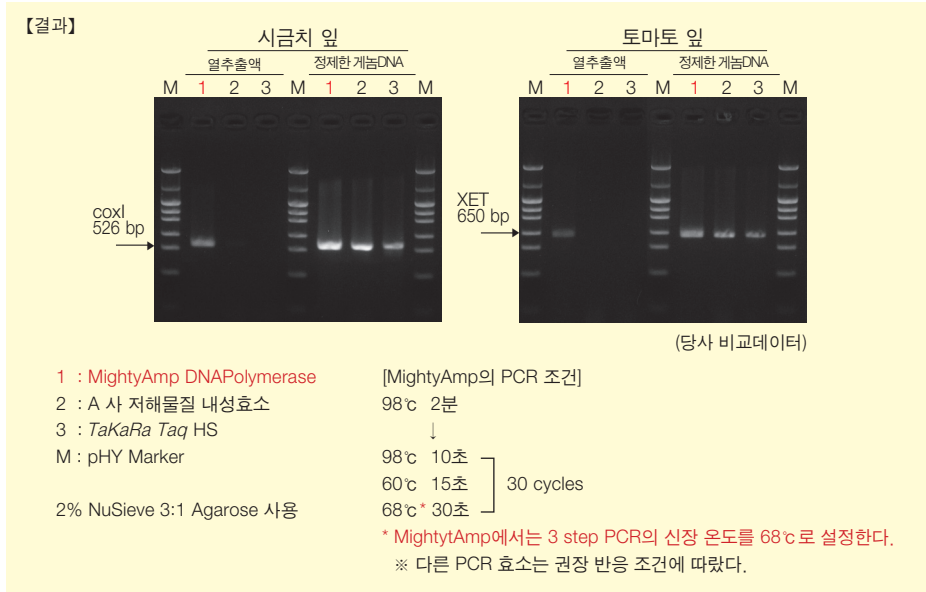


그림 8. 식물의 열추출액을 주형으로 한 PCR 증폭

■ **관련제품**

제품명	용량	TaKaRa Code
Plant DNA Isolation Reagent	100 회	9194
Agarose LO3	100 g	5003
NuSieve 3:1 Agarose	125 g	50090
Thermal Cycler Dice Gradient	1 대	TP600
Mupid-2 plus	1 Set	AD110

\* License Notice : [2]

NEW

## TaKaRa PCR Enzymes

# [Special Edition for Hot Start PCR]

특징	Loading dye가 포함된 2x HS premix	증폭속도가 빠른 2x HS premix (10초/kb)	Crude 샘플증폭에 최적인 HS Polymerase
제품명	EmeraldAmp PCR Master Mix	SapphireAmp Fast PCR Master Mix	MightyAmp DNA Polymerase
TaKaRa Code	RR300A	RR350A	R070A